蝶と蛾 *Lepidoptera Science* **66** (3/4): 83–89, December 2015

分子系統により分割された日本産ウラギンヒョウモン2型のケージペアリング実験 — 2型は別種である —

北原　曜[1)]・伊藤建夫[2)]

[1)] 396-0014　長野県伊那市狐島4224-1
[2)] 390-8621　長野県松本市旭3-1-1　信州大学理学部

Two haplotypes of *Argynnis (Fabriciana) adippe pallescens* divided by molecular phylogeny shown to be distinct species by cage pairing experiments

Hikaru KITAHARA[1)] and Tateo ITOH[2)]

[1)] 4224-1 Kitsunejima, Ina, Nagano, 396-0014 Japan
[2)] Department of Biology, Faculty of Science, Shinshu University, 3-1-1 Asahi, Matsumoto, 390-8621 Japan

Abstract Genetic analysis of female *Argynnis* (*Fabriciana*) *adippe pallescens* specimens (n=8) collected in Nagano Prefecture revealed two distinct haplotypes. Adult butterflies obtained from the fertilized eggs deposited by the females of both haplotypes were used in cage pairing experiments. While the morphological differentiation is small between two haplotypes, the shape of the dorsal lines of the mature larvae, the background color and mottled markings on the underside of the hindwings of the adults can be used for species identification. No copulation was observed between individuals of the two haplotypes in the cage pairing experiment, suggesting the existence of premating isolation between the two haplotypes.

Key words *Argynnis* (*Fabriciana*), cage pairing, molecular phylogeny, *mt*DNA, reproductive isolation.

はじめに

新川・石川（2005）は，日本各地のウラギンヒョウモン *Argynnis* (*Fabriciana*) *adippe pallescens*の*mt*DNAを分析し，ヤマウラギンヒョウモン（以下，ヤマ），サトウラギンヒョウモン（以下，サト），ヒメウラギンヒョウモン（以下，ヒメ）の3種に分割した．また，この遺伝子解析結果が，体表炭化水素，♂交尾器，香鱗の違いとよく対応しているとした．3種の形態的差としては，斑紋は変異が激しく分類の根拠とすることが難しいとし，主に翅型の違いを指摘している．また同時に，極東地域などのウラギンヒョウモン類の*mt*DNAも分析し，ヤマは*A. niobe*を姉妹群とする系統，サトとヒメは*A. adippe*や*A. vorax*の共通祖先から派生した系統とした．これら3種のうち，ヒメを除くヤマとサトは，長野県を含む我が国各地に分布し，比較的高標高地にヤマ，低標高地にサトが主に分布し混棲するが，交雑はないと推定している．この報告を受けて，白水(2006)の「日本産蝶類標準図鑑」では，日本産ウラギンヒョウモンが2種に分割されることに触れているが，正式な分類学的処置がなされていないことから従来通り1種として掲載している．その後は日本産ウラギンヒョウモンに関する報告はなく，最新の日本産蝶類を紹介している日本チョウ類保全協会編(2012)の「フィールドガイド日本の蝶」においても，ウラギンヒョウモンは1種としている．その他にも日本のウラギンヒョウモンについて論じたものはある（猪又，2014；西山，2015）が，いずれも分類，記載がきちんと行われていない現状では，1種と見なしておくしかないとしている．このように，日本産ウラギンヒョウモンは従来の1種のままとされることも多く，またその後の研究は進展がみられず，3種として認知すべきかどうかも含めて混沌とした状態が続いている．

このように，日本産ウラギンヒョウモンに3種存在するのかどうか，遺伝子等の違いが別種として真に交配が生じないレベルに達しているのか，交配した場合に生殖能力のあるF1が発生するのかどうかは全く未解明なままである．
そこで本研究では，長野県内に遺伝子型から見て明瞭に異なる2系統のウラギンヒョウモンが存在するか否かを確認することと，またその2系統間に生殖隔離が存在するかどうかを交配実験により明らかにすることを目的とした．

材料および方法

2014年9月に長野県内の2ヶ所でウラギンヒョウモンを8♀採集（表1）し，口径12cm，高さ12cmの円筒形プラスチックに1♀ずつ分けて入れ採卵した．各母蝶は採卵後に遺伝子解析のため凍結保存した．

1. 母蝶の遺伝子解析

凍結保存した各個体の脚1本からDNAを抽出した．表2に示したように，得られたDNAについてプライマー Ron(F)

とHobbes(R)を用いて（Simon *et al.*,1994；Monteiro and Pierce, 2001），ミトコンドリア *COI* 遺伝子の一部の配列を増幅した後，直接配列決定法により436塩基対の領域の配列を決定した.

2. 幼生期の飼育

各♀から得られた卵は，♀ごとに個別飼育し，幼生期の比較を行った．卵は，乾燥と過湿に注意して越冬させ，翌春孵化させた．孵化後すぐに，屋外の鉢に植えたアメリカスミレサイシン*Viola sororia*に接種し，以後蛹化するまで鉢の袋掛け飼育とした．蛹化後，室内に回収し羽化させ，一部は成虫の比較検討のため標本にし，他はケージペアリングに供した.

3. ケージペアリング実験

ケージは，底面以外の5面に寒冷紗を張った幅22.5cm，奥行き30cm，高さ30cmの直方体ケージとした．底面はベニヤ板である．各ケージには，羽化後3日以上経過した2♂と，当日または前日に羽化した1♀を入れた．♂は早朝5時頃に給餌したのちケージ内に入れた．ケージは，日射が始まる6時前に長野県伊那市の屋外に設置し13時に回収した（図1）．この間，継続して観察を行い，交尾が確認されたら交尾している♂♀をすぐ回収し，そのケージの実験を終了した．気温が高い日や日射が強い日は，成虫の活動が激しいので，10時頃給餌を挟んだ．この間，交尾が確認されない組み合わせについては，曇天や降雨日を除き3日間継続したが，13時から翌朝のケージペアリング開始までは♂♀を分離して保管した．3日間交尾に至らない場合は「交尾なし」として終了した．ケージペアリングは，2015年6月11～20日に行った.

以上のケージペアリングで得られた交尾済み♀は，短日処理後採卵した．採卵は各♀から200卵程度得て，卵内の幼虫形成の有無など状態を観察した.

表1. 採卵と交配実験に使用した「ウラギンヒョウモン」成虫♀.

Table 1. Female adult *Argynnis* (*Fabriciana*) *adippe pallescens* from which eggs were obtained and grown to adulthood for use in the cage pairing experiment.

Female identification	Collection site	Elevation(m)	Collection date
Y1	Yabuhara ski resort, Kiso village, Nagano Pref.	1200	Sept. 2, 2014
Y2	*Ditto*	1200	Sept. 2, 2014
Y3	*Ditto*	1200	Sept. 2, 2014
Y4	*Ditto*	1200	Sept. 2, 2014
Y5	*Ditto*	1200	Sept. 2, 2014
Y6	*Ditto*	1200	Sept. 2, 2014
Y7	*Ditto*	1200	Sept. 2, 2014
S1	Nozokiishi, Suwa City, Nagano Pref.	1050	Sept. 6, 2014

表2. PCRと塩基配列決定に用いたプライマー.

Table 2. Oligonucleotide primers used for PCR and sequencing reaction.

Primer name	Sequence	Reference
Ron(F)	5'-GGATCACCTGATATAGCATTCCC-3'	Simon *et al.*, 1994
Hobbes(R)	5'-AAATGTTGNGGRAAAAATGTTA-3'	Monteiro and Pierce, 2001
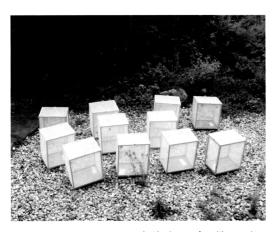
図1．ケージペアリング実験（2015年6月12日）．
Fig. 1. Cage pairing experiment (June 12, 2015).
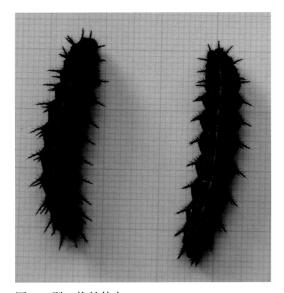
図2．2型の終齢幼虫．
左：A型（Y3），右：B型（Y6）
Fig. 2. Mature larvae of each of the two haplotypes.
Left: Haplotype A (Y3); right: Haplotype B (Y6).

結果

1. 採集した♀の遺伝子解析

表3に遺伝子解析に用いた母蝶の遺伝子型を示す．ミトコンドリア *COI*遺伝子の436塩基の領域を比較したところ，二つの遺伝子型（A型とB型とする）が見出され，それらの間には11塩基対（2.5％）の違いがあった．A型のY3，Y4，S1およびB型のY1，Y2，Y5，Y6，Y7はそれぞれ同一の配列であった．7♀を採集した木祖村藪原スキー場では，A型とB型が混在していた．飼育に用いた卵は，A型がY3，Y4，S1，B型がY1，Y2，Y6，Y7の各♀から得られた卵とした．なお現在のところ，日本産ウラギンヒョウモンについては，長野県産の個体のミトコンドリア *COI*遺伝子の配列が1件（本論文で比較した436塩基対の領域内では1塩基対の置換があるがA型にきわめて近い．比較のため表3の最下段に示した）だけGenBankに見出されるほかは，詳細な遺伝子配列の報告が行われておらず，また新川・石川(2005)のヤマ，サトの遺伝子型の遺伝子配列が不明なため，本論文ではAとBの2型として表現する．

2. 終齢幼虫と成虫の比較

図2に両型の終齢幼虫を示す．一見して判るように，A型とB型は非常に似ており，また個体変異もあるが，A型の背線はB型のそれより細く，また各節の突起基部付近で不明瞭となる．次に図3に成虫♂，図4に成虫♀を示す．両図とも上2段が，A型のY3，Y4，S1由来のもの，下2段がB型のY1, Y6, Y7由来のものである．まず♂の翅表については，翅形，地色，斑紋に明確な差は認めらなかった．新川・石川(2005)は，ヤマとサトでは翅表の地色と翅形が異なるとしているが，個体変異があり明確な差は認められなかった．一方，♂翅裏については後翅で明確な差があり，地色がA型では明るい黄緑色，B型では濃緑色で，またA型では4〜6室の中室に接する部分に黄色班が認められるが，B型では地色のままであり黄色班は認められない（図3の黄色の丸印）．さらに後翅裏面の銀紋はA型がB型より大きい．♀については♂より判別が難しく，後翅裏面の地色がA型は緑褐色，B型は褐色が強くより暗色となる．

表3. ウラギンヒョウモンのミトコンドリア*COI*遺伝子の２遺伝子型の塩基配列の比較.
Table 3. Comparison of the nucleotide sequences of the two haplotypes of mitochondrial *COI* gene of *Argynnis* (*Fabriciana*) *adippe pallescens*.

Specimen identification	Nucleotide position												Haplotype	Accession number
	77	89	101	165	185	207	215	242	284	353	383	390		
Y1,Y2,Y5,Y6,Y7	C	C	T	T	C	A	C	T	C	C	T	C	Haplotype B	LC093260
Y3, Y4, S1	T	T	C	C	T	G	T	C	T	T	C	C	Haplotype A	LC093259
t017	T	T	C	C	T	G	T	C	T	T	C	T	(Haplotype A)	AB855832
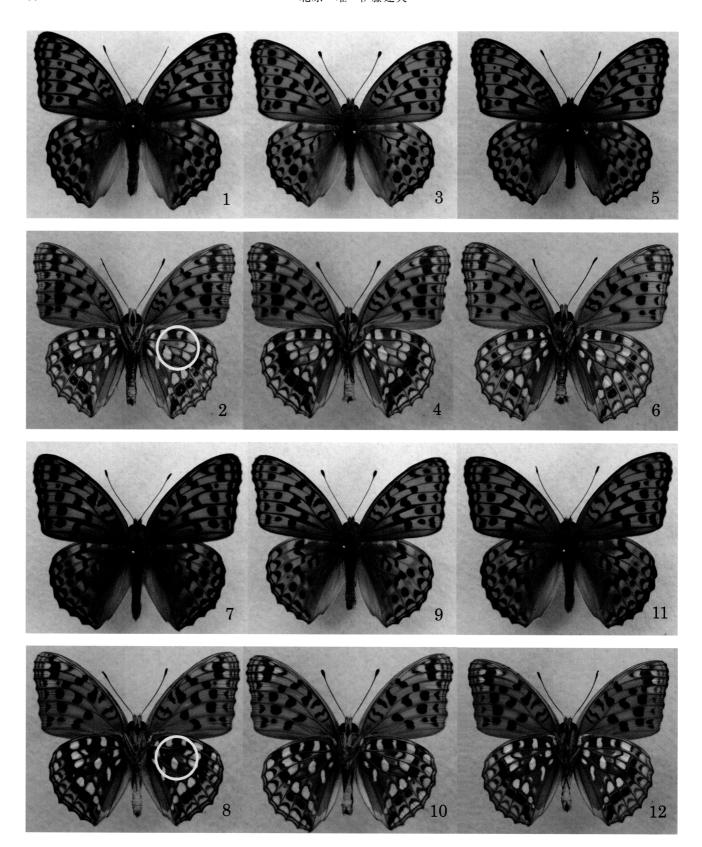
図3．飼育羽化したA型（上2段）とB型（下2段）の♂表裏．
上2段：左よりY3，Y4，S1，下2段：Y1，Y6，Y7．
黄色の丸はA型とB型の大きな相違点を示す．

Fig. 3. Emerged male adults of Haplotype A and Haplotype B.
Haplotype A: 1,2:Y3; 3,4:Y4; 5,6:S1. Haplotype B: 7,8:Y1; 9,10:Y6; 11,12:Y7.
A yellow circle shows a large difference between the two haplotypes, A and B.
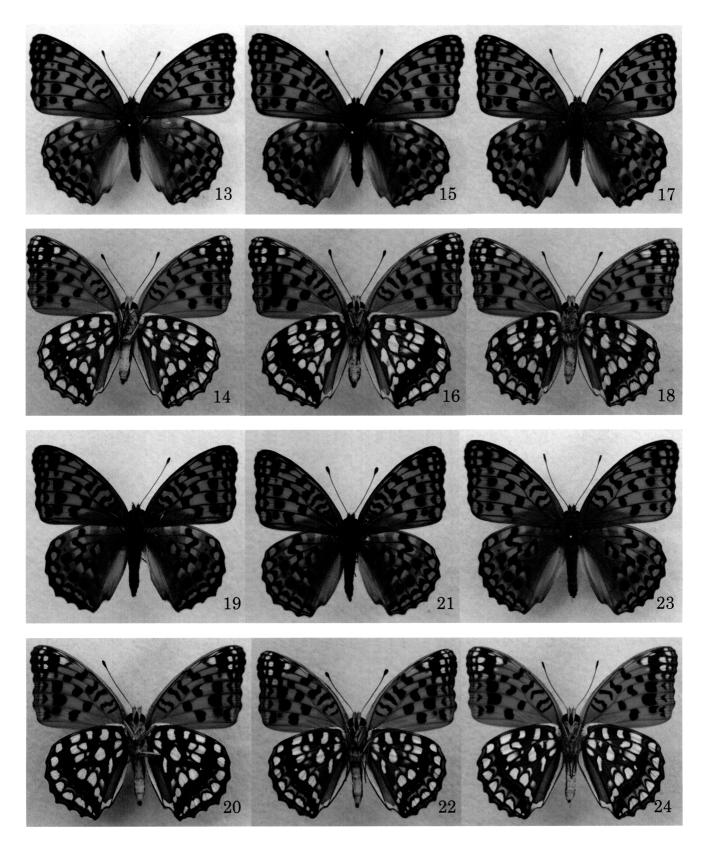
図4. 飼育羽化したA型（上段）とB型（下段）の♀表裏.
上段：左よりY3, Y4, S1, 下段：Y1, Y6, Y7.
Fig. 4. Emerged female adults of Haplotype A and Haplotype B.
Haplotype A: 13,14:Y3; 15,16:Y4; 17,18:S1. Haplotype B: 19,20:Y1; 21,22:Y6; 23,24:Y7.

表4. ケージペアリングの結果.
Table 4. Results of cage pairing experiment.

			Female			
			Haplotype A		Haplotype B	
			Y3	S1	Y1	Y6
Male	Haplotype A	Y3	1/1	1/1	0/2	0/1
		S1	1/1	1/1	0/3	0/1
	Haplotype B	Y1	0/1	0/2	1/1	1/1
		Y6	0/2	0/1	1/1	1/1

The denominator indicates the number of cage pairing set (2♂1♀) tested, and the numerator indicates the number of copulation events.

3. ケージペアリング実験

ケージペアリングに使用した成虫は，A型がY3とS1，B型がY1とY6とした．ケージペアリングはこれらの全ての組み合わせについて行い，繰り返しを1～3組行った．表4にケージペアリング実験の結果を示す．まず，同型雌雄間では全ての組み合わせで交尾が成立した．同型間では，♂の入れてあるケージに♀を入れ日射が当たってから1～40分（全8例の平均22分）で交尾が成立した．異型間では，3日間のペアリング期間でも全ての組み合わせについて交尾が成立しなかった. 異型間の場合のケージ内の状況を見ると，♂♀とも相手に無関心であるが，♀に♂が偶然近づくと♀は落下するように♂を避ける場合があった.

ケージペアリングによる同型間の交尾済み8♀から得られた卵は，どの組み合わせともほぼ全卵が産卵翌日には黄色から淡褐色に変色し受精卵であることが確認でき，さらにその後は卵内幼虫が形成されるのが確認された.

考　察

遺伝子解析により分割されたA，B型は，ケージペアリング実験で異型間では交尾しないことから交配前隔離が確認された．このことから，両型は生物学的種概念から別種と判断される．A，B両型が，新川・石川(2005)の分割したヤマとサトのどれに該当するのかは，明確な遺伝子配列が示されていないため断定ができないが，*A. niobe*（JF853516など）や*A. adippe* (JF415669など)の遺伝子配列との比較から推定すると，ヤマがA型，サトがB型と考えられる．ケージ内の行動から，新川・石川(2005) が指摘しているように，おそらく両型で匂い物質が異なり交尾しないと考えられた．形態形質による両型の判別法については，地域変異が存在する可能性はあるが，新鮮な個体であれば，♂は前述したように斑紋で判別可能である．♀については判別が難しいが，後翅裏面の地色で判別がある程度可能である.

おわりに

両型が互いに別種であると判断され，両型の成虫の識別法が提示されたため，これをもとに今後は全国的な両種の分布の違い，生態の違い，幼生期を含めた詳細な形態の違いを明らかにしていくべきであろう．また，もう1種，新川・石川(2005)のヒメウラギンヒョウモンがどのようなものであるのかも明らかにしていく必要があろう.

なお，大陸の近縁種との関係が不明確なため，学名については保留せざるを得なく，また和名についてもヤマ，サトがふさわしいのか，分布状況の全貌が明らかになっていないので保留にしたい.

末尾ながら，信州大学理学部の濱本健汰氏には遺伝子解析にご協力いただいた．深く感謝申し上げる.

引用文献

猪又敏男, 2014.　連載・日本のチョウ（37）大型ヒョウモン (4). 月刊むし(524)：23-32.
日本蝶類保全協会編，2012．フィールドガイド日本のチョウ．327pp.，誠文堂新光社，東京.
Monteiro, A. and N. E. Pierce, 2001. Phylogeny of *Bicyclus* (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from *COI*, *COII*, and *EF-1*alpha gene sequences. *Molec. Phyl. Evol.* **18**: 264-281.
西山保典，2015．*Fabriciana*ウラギンヒョウモン属の問題．ツーイーソー (1532)：249-256.
新川　勉・石川　統, 2005. 分子系統による日本産ウラギンヒョウモン3種の形態．昆虫と自然**40**(13)：4-7.
白水　隆，2006．日本産蝶類標準図鑑．336pp.，学習研究社，東京.
Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu and P. Flook, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **37**: 651-701.

Summary

In 2005 Shinkawa and Ishikawa reported that the species *Argynnis* (*Fabriciana*) *adippe pallescens* on the main islands of Japan consists of two distinct species based on the mitochondrial DNA analysis. The morphological differences and reproductive isolation between the two species, however, have not been clarified since then.

Genetic analysis of female *Argynnis* (*Fabriciana*) *adippe pallescens* specimens (n=8) collected in Nagano Prefecture revealed two distinct haplotypes. Adult butterflies obtained from the fertilized eggs deposited by females of both haplotypes were used in cage pairing experiments. While the morphological differentiation is small between the two haplotypes, the shape of the dorsal lines of the mature larvae, the background color and mottled markings on the underside of the hindwings of the adults can be used for species identification. No copulation was observed between individuals of the two haplotypes in the cage pairing experiment, suggesting the existence of premating isolation between the two haplotypes.

Based on the results presented in this paper we conclude that these two haplotypes are distinct species.

(Received August 21, 2015. Accepted November 12, 2015)